

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006 年～2008 年  
 課題番号：18405021  
 研究課題名（和文） ペチュニア属遺伝資源の最終探査と種分化および  
 種内変異に関する研究  
 研究課題名（英文） The final expedition for wild *Petunia* genetic resources and  
 studies on speciation and intraspecific variations  
 研究代表者  
 安藤 敏夫（ANDO TOSHIO）  
 千葉大学・園芸学研究科・教授  
 研究者番号：30026588

研究成果の概要：ブラジルとアルゼンチンの自生地調査を計 60 日間行い、アルゼンチンのサンタフェ州とコルドバ州に自生するペチュニア・アキシラリスの極小輪の新種内分類群を発見した。また、色素合成系遺伝子（*Hfl*, *Rt*）を解析し、ペチュニア属が 2 群に分かれること、園芸品種の *Rt* はラプラタ河沿岸に自生するアキシラリスに由来すること、*Hfl* はアキシラリスとインテグリフォリアの遺伝子が組換えを起こしたものであることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：花卉園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ペチュニア、野生遺伝資源、アルゼンチン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の全体構想は「南アメリカ大陸の植物遺伝資源、特にペチュニア属の解析」と表現可能であり、1988 年の研究開始からすでに 17 年の歴史をもっている。その間に著したペチュニア属に関する原著論文は 50 編に及ぼうとしている。

ペチュニアは修景用草花の最大アイテムであり、なおかつ園芸植物の中ではキンギョソウと並ぶ分子生物学のモデル植物でありながら、野生種の研究はほとんど行われてこなかった。ペチュニア属が、北半球の園芸学や分子生物学の先進地域から遠く離れた、アクセスしにくい地域に分布することがその一因と考えられる。そのた

め、今日ペチュニア属の半数近く(15 種中の 7 種と 1 亜種)は研究代表者らが記載した新種となっている(Ando & Hashimoto, 1993, 1994, 1995, 1996, 1998; Ando, 1996)。

研究代表者は「フィールドから DNA まで」をスローガンとして、(1)フィールド調査(遺伝資源の収集・生態調査など)、(2)大規模栽培(遺伝資源としての機能評価など)、(3)DNA 解析(系統進化・有用遺伝子のクローニングなど)を 3 本柱とした新たな学術＝「園芸植物遺伝資源学」の確立を目指してきた。

このように、研究の全体構想は、園芸学、植物分類・系統学、植物生態学、分子生物学と重なる新たな学際領域の見本作りでもある。日本から

最も遠い南アメリカ大陸をフィールドとする理由には、後続の若手研究者にこの学術の魅力を伝えたいことも含まれている。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、研究の全体構想の最終章に位置づけられるものである。17年間で費やして、これまでウルグアイ(全域)、ブラジル(南部3州: Rio Grande do Sul 州、Santa Catarina 州、Parana 州)、パラグアイ(東半分)の調査を概ね完了したため、近年ではアルゼンチンに傾注している。本研究課題の具体的な目標は以下のとおりである。

- (1) 自生地探査: 最終の自生地探査として、ペチュニア属分布域の辺縁部分、極限状態のペチュニアに的を絞った探索を行う。
- (2) 種分化研究: ペチュニア属の全種全域の収集が完了するので、より多くの分子情報を得て、ペチュニア属の系統進化及び種分化の実態を明確にする。
- (3) 多様性研究: 分布域全域から収集された材料を用いて、ペチュニア属の種内変異と分子レベルの多様性の実態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 自生地探査: アルゼンチン北東部に赴き、自動車を借り上げて海外研究協力者とともにペチュニア属および近縁のカリブラコア属自生地の探査を行った。このコルドバ州東部とサンタフェ州を中心とした地域はペチュニア自生地の範囲内と思われるが、これまでに野生個体群を多く観察していなかった。
- (2) 栽培実験: 野生個体群由来の種子から植物を育成し、千葉県松戸市の千葉大学園芸学研究科研究温室で同一条件下でポット栽培し、花器形態の計測および人工交配による自家不和合性の調査を行った。
- (3) 葉緑体 DNA の種内変異: 栽培した野生種の葉から全 DNA を抽出し、葉緑体 DNA 遺伝子間配列をユニバーサルプライマーを用いて PCR で増幅し、制限酵素処理を行って断片長の多型を得る PCR-RFLP 法によって、種内変異を調査した。
- (4) 花色素合成系遺伝子の解析: 栽培した野生種の葉から DNA を抽出し、既知の塩基配列から設計したプライマーを用いた PCR 法によって花色素合成系遺伝子である *Hfl* (Flavonol-3'-5'-hydroxylase をコードする) および *Rt* (Rhamnosyl transferase) の全塩基配列を決定し、系統解析および系統地理学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 自生地探査

平成 18、19、20 年度の3回アルゼンチンにおいてペチュニア属の自生地探査を行った。アル

ゼンチン北東部のエントレリオス州、コリエンテス州、コルドバ州、サンタフェ州の計 121 地点においてペチュニアおよびカリブラコア属の植物を調査し、標本および種子の採集を行った。3回の探査における総走行距離は 11,332 km におよんだ。分布域の周辺部の調査であり、気候もペチュニア属植物には比較的厳しいため、走行距離あたりの調査地点はブラジル南部やウルグアイと比較して少なかった。

### (2) *Petunia axillaris* の新種内分類群

アルゼンチンのコルドバ・サンタフェ両州で *P. axillaris* に似るが、既知の3亜種 (*axillaris*, *parodii*, *subandina*) よりも明らかに花の小さい個体群を発見した(以下、コルドバ産 *axillaris*)。現地乾燥条件による小輪化が疑われたため、アルゼンチンおよびウルグアイの 49 個体群から採集した種子を千葉大学園芸学研究科の研究温室で同一条件下で栽培し、花器形態を多変量解析に供した。クラスター分析の結果、コルドバ産 *axillaris* は独立したクラスターを形成し、一元配置分散分析の結果、計測した 17 形質中 8 形質においてコルドバ産 *axillaris* と他の亜種との間に有意差が認められた。採集地点をクラスター別に地図上にプロットしたところ、形態的に特異なコルドバ産 *axillaris* はコルドバ州東部からサンタフェ州南部にのみ分布していた(図1)。この地域は亜種 *parodii* と *subandina* の分布域の間にあることから、両亜種の種間交雑が原因であることも考えられたが、両亜種を人工交雑した後代の形質はコルドバ産 *axillaris* とは異なった。以上の結果、コルドバ産 *axillaris* は新種内分類群である可能性が高いことが判明した。

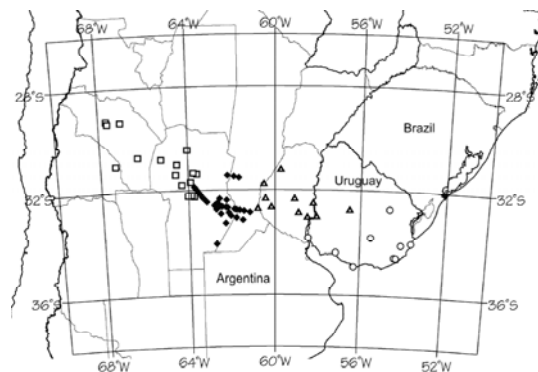


図1 アルゼンチン中部とウルグアイの *P. axillaris* の分布

○: 亜種 *axillaris*、△: *parodii*、□: *subandina*、◆: コルドバ産

### (3) *Petunia axillaris* の自家(不)和合性の分布

研究代表者らは既にウルグアイにおける *P. axillaris* の自家(不)和合性の分布を発表しているが、今回さらに分布域全体についてこれを調査した。*P. axillaris* は亜種 *axillaris*, *parodii*, *subandina* に分類されるが、*parodii* と *subandina* は全個体群が自家和合性であった(図2)。しか

し、亜種 *axillaris* についてはラプラタ河沿岸地域のみならず自家不和合性個体群がみられ、ブラジルやアルゼンチン内陸の個体群は自家和合性であった。*P. axillaris* については過去の文献で和合/不和合の記述が混乱していたが、本研究によってその議論に終止符が打たれた。ペチュニア属は世界的に使われている自家不和合性研究のモデル植物の一つであり、特に品種の起源種でもある *P. axillaris* の(不)和合性の分布を明らかにしたことは学術的に大きなインパクトをもつ。

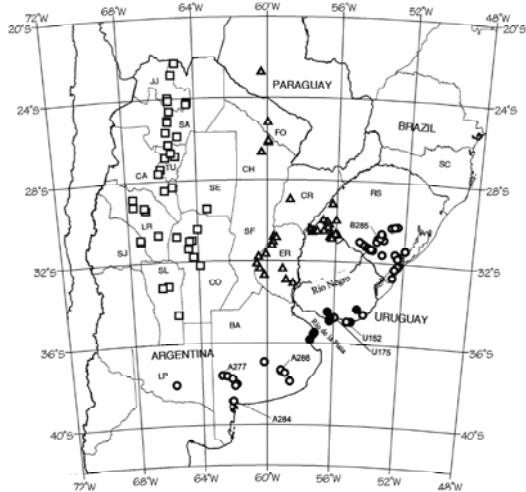


図2 *Petunia axillaris* の自家(不)和合性の分布 白抜きは自家和合性、塗りつぶしは自家不和合性、○: 亜種 *axillaris*, △: *parodii*, □: *subandina*

#### (4) *Petunia integrifolia* と *P. inflata* の系統地理学的構造

*P. integrifolia* と *P. inflata* において7種類の葉緑体 DNA 遺伝子間領域と制限酵素の組み合わせで多型が確認された。これにより *P. integrifolia* と *P. inflata* の葉緑体ハプロタイプは10種に分類され、系統解析の結果、2つのクレードを形成した。片方のクレードには *P. integrifolia* のみが含まれ、含まれるハプロタイプを IT1～IT5 とした。もう一方は主に *P. inflata* から構成され、IF1～IF5 とした。図3でこれを地図上に示した。IF1 は *P. integrifolia* にもみられ(△)、その分布域が *P. inflata* の分布域に近いことから、2種間で遺伝子浸透が起きていることが判明した。また、IT2 はウルグアイ中部を流れる Río Negro 付近に、IF4 はブラジル南部の高地に特異的であった。IF4 の分布域付近には多種が存在するため、それらの遺伝子浸透も考慮する必要がある。以上の結果、*P. integrifolia* と *P. inflata* の系統地理学的構造が示され、遺伝子の動態の一部が明らかになった。今後は品種の葉緑体ハプロタイプを調査することで、品種の歴史的な交雑親の起源地域が特定できる可能性が示された。

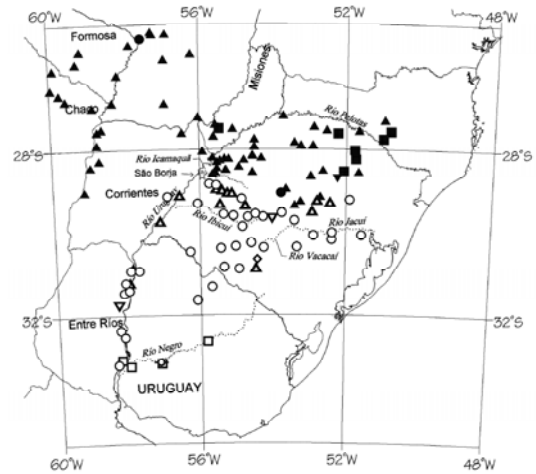


図3 *P. integrifolia* と *P. inflata* の葉緑体ハプロタイプの分布

白抜き:*P. integrifolia*、黒塗り:*P. inflata*、  
▲, △:IF1、●:IF2、◆:IF3、■:IF4、▼:IF5、  
○:IT1、□:IT2、▽:IT3、-○:IT4、◇:IT5

#### (5) *Hf1* 遺伝子

ペチュニア属の全野生種19分類群および市販品種の *Hf1* 遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。*Hf1* はすべての種で3つのエクソンと2つのイントロンから構成されていたが、第2エクソンの長さは種によって大きく異なった。エクソン部分の配列を用い、外群として GenBank に登録されている *Nierembergia* sp. とジャガイモの Flavonol-3'5'-hydroxylase (F3'5'H) 遺伝子の cDNA 配列、ペチュニア属のもう一つの F3'5'H である *Hf2* を加えて系統解析を行ったところ、野生種は大きく2つのクレードを形成した(図4)。

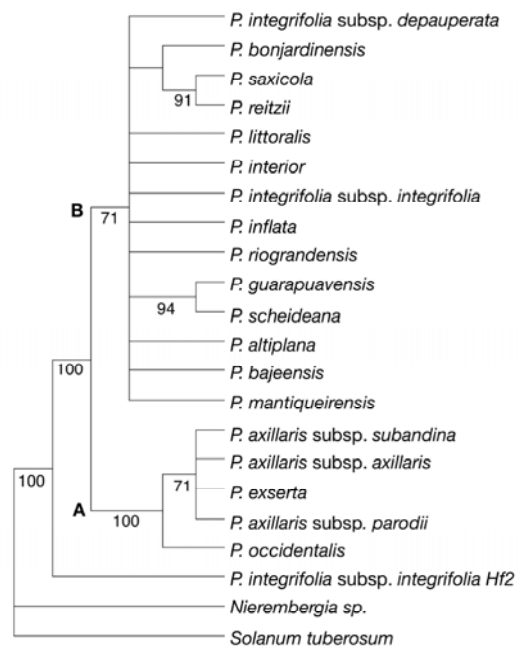


図4 エクソン配列による *Hf1* の系統樹

クレード A には *P. axillaris*, *P. exserta*, *P. occidentalis* が含まれたが、これらの種は開花後の花茎が下曲しないなど、形態的にも区別できた。

市販品種の *Hfl* は優性の *Hflc*、それぞれトランスポゾンとレトロトランスポゾンの挿入によって機能を失った劣性の *hf1-2* と *hf1-3* が知られている。野生種、優性の *Hflc*、劣性の *hf1-2*, *hf1-3* からトランスポゾンを除外した配列を野生種と比較したところ、*Hflc* と *hf1-3* が一致したが、野生種とは異なった。*hf1-2* は *P. integrifolia*, *P. inflata* と一致した。さらに詳細に検討したところ、*Hflc* と *hf1-3* の配列は部分的に *P. axillaris* または *P. integrifolia*, *P. inflata* と相同で、交雑によって組換えられた遺伝子であることが示唆された。

#### (6) *Rt* 遺伝子

ペチュニア属の全野生種 19 分類群および市販園芸品種 ‘Celebrity Blue’ の *Rt* 遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。GenBank の *P. ‘Old Glory Blue’*、外群としてトマトと *Nierembergia* sp. の *Rt* を加えて系統解析を行ったところ、ペチュニア属の *Rt* は *Hfl* と同様に大きく2つのクレードを形成し、園芸品種は *P. axillaris*, *P. exserta*, *P. occidentalis* から成るクレードに含まれた。園芸品種の交雑親の一つは *P. axillaris* subsp. *axillaris* であるため、園芸品種の *Rt* はこの野生種に由来すると考えられた。第6染色体に座乗する *Rt* の近傍に *P. axillaris* にしかない、園芸学的に重要な遺伝子が存在していて、園芸品種の育種の初期に優先的に選抜された可能性が示唆された。

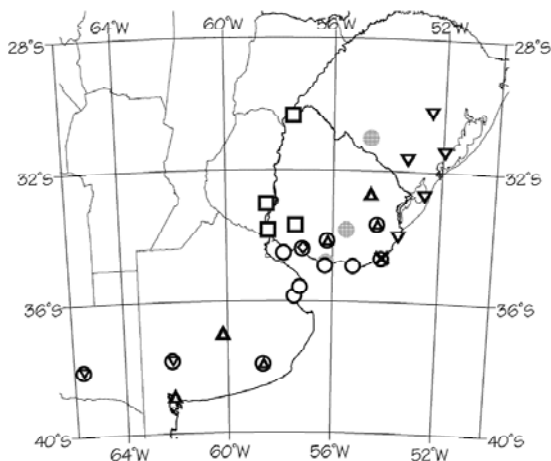


図5 *P. axillaris* の *Rt* ハプロタイプの分布

○: I型, △: II型, □: III型, ▽: IV型, ◇: V型, ×: VI型, ●: I~XI型混合

また、園芸品種と *P. axillaris* の 25 野生個体群由来の *Rt* 配列を比較したところ、11 のハプロタイプに分類でき、園芸品種の *Rt* は I 型であった。ハプロタイプを地図上にプロットしたところ(図5)、ラプラタ河沿岸地域にのみ I 型 *Rt* をホモで持つ個体群が集中していることから、園芸品種の交

配親に使われた個体がこの地域由来である可能性が示された。これは最初の *P. axillaris* がウругアイのモンデビデオで採集された事実と矛盾しない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- ① Chen, S., K. Matsubara, T. Omori, H. Kokubun, H. Kodama, H. Watanabe, G. Hashimoto, E. Marchesi, L. Bullrich, T. Ando, Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *Hfl* gene, *Journal of Plant Research*, 120, 385–397, 2007, 査読あり
- ② Chen, S., K. Matsubara, H. Kokubun, H. Kodama, H. Watanabe, E. Marchesi, T. Ando, Reconstructing historical events that occurred in the *petunia Hfl* gene, which governs anthocyanin biosynthesis and effects of artificial selection by breeding, *Breeding Science*, 57, 203–211, 2007, 査読あり
- ③ Kokubun, H., M. Nakano, T. Tsukamoto, H. Watanabe, G. Hashimoto, E. Marchesi, L. Bullrich, I. L. Basualdo, T.-h. Kao, T. Ando, Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay, *Journal of Plant Research*, 119, 419–430, 2006, 査読あり

[学会発表](計5件)

- ① 落合忍、松原紀嘉、Goro Hashimoto、Eduardo Marchesi、Laura Bullrich、安藤敏夫、ペチュニア品種の *Rt* 遺伝子の起源地域、園芸学会平成 21 年度春季大会、2009 年 3 月 19 日、明治大学駿河台キャンパス(東京都千代田区)
- ② 池松秀朗、Silvina Soto、Julian Greppi、安藤敏夫、アルゼンチン・コルドバ州とサンタフェ州の *Petunia axillaris*、園芸学会平成 20 年度秋季大会、2008 年 9 月 27 日、三重大学(三重県津市)
- ③ 西山絵梨香、Goro Hashimoto、Eduardo Marchesi、Isabela L. Basualdo、Laura Bullrich、安藤敏夫、*Petunia integrifolia* と *P. inflata* の系統地理学的構造と遺伝子浸透、園芸学会平成 20 年度春季大会、2008 年 3 月 28 日、東京農業大学厚木キャンパス(神奈川県厚木市)
- ④ 竹原龍太郎、渡辺均、國分尚、Goro Hashimoto、Laura Bullrich、安藤敏夫、*Calibrachoa* 属の花筒色の遺伝、園芸学会平成 20 年度春季大会、2008 年 3 月 28 日、東京農業大学厚木キャンパス(神奈川県

- 厚木市)  
⑤ 落合 忍、松原 紀嘉、Goro Hashimoto、  
Eduardo Marchesi、Isabela L. Basualdo、  
Laura Bullrich、安藤敏夫、ペチュニア品種  
のアントシアニン合成系鍵遺伝子*Rt*の起源、  
園芸学会平成 20 年度春季大会、2008 年 3  
月 28 日、東京農業大学厚木キャンパス  
(神奈川県厚木市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安藤 敏夫 (ANDO TOSHIO)  
千葉大学・園芸学研究科・教授  
研究者番号:30026588

### (2)研究分担者

三位 正洋 (MII MASAHIRO)  
千葉大学・園芸学研究科・教授  
研究者番号:30093074

上原 浩一 (UEHARA KOICHI)  
千葉大学・園芸学研究科・助教  
研究者番号:20221799

國分 尚 (KOKUBUN HISASHI)  
千葉大学・環境健康フィールド科学センター・  
准教授  
研究者番号:20282452

渡辺 均 (WATANABE HITOSHI)  
千葉大学・環境健康フィールド科学センター・  
准教授  
研究者番号:80301092

### (3)連携研究者

なし

### (4)海外研究協力者

Goro Hashimoto  
ブラジル・サンパウロ州自然史研究所・所長

Laura Bullrich  
アルゼンチン国立農牧技術院・花卉研究所・  
所長

Silvina Soto  
アルゼンチン国立農牧技術院・花卉研究所・  
研究員

Julian Greppi

アルゼンチン国立農牧技術院・生物資源研究  
所・研究員